

Jordan and Hamburg LLP
F-7029
Kanji MINATO, et al.

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JC872 U.S. Pat.
09/885829
06/20/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 6月22日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-187893

出 願 人

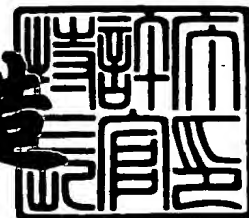
Applicant (s):

株式会社ティエス植物研究所

2001年 4月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3026118

【書類名】 特許願

【整理番号】 000622KTP1

【提出日】 平成12年 6月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01N 63/00

【発明の名称】 種子病害防除方法

【請求項の数】 6

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県甲賀郡石部町石部中央4丁目6番11号

 【氏名】 湊 莞爾

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県甲賀郡甲西町大字針59番地の27

 【氏名】 茂田 勝美

【特許出願人】

 【識別番号】 594003104

 【住所又は居所】 滋賀県甲賀郡甲西町夏見八田ヶ谷1966

 【氏名又は名称】 株式会社テイエス植物研究所

【代理人】

 【識別番号】 100059225

 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区瓦町1丁目7番1号 第百生命大阪
瓦町ビル8階 蔦田内外国特許事務所

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 蔦田 璋子

 【電話番号】 06-6227-5535

【選任した代理人】

 【識別番号】 100076314

 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区瓦町1丁目7番1号 第百生命大
阪瓦町ビル8階 蔦田内外国特許事務所

 【弁理士】

【氏名又は名称】 薦田 正人

【電話番号】 06-6227-5535

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008589

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9402794

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 種子病害防除方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

種子に対して物理的及び／又は化学的手法による消毒を施し、
消毒した種子を種子伝染性病害の病原体に対して拮抗性を持つ有効微生物で処理する

ことを特徴とする種子病害防除方法。

【請求項 2】

前記有効微生物が複数種類の微生物である

ことを特徴とする請求項 1 記載の種子病害防除方法。

【請求項 3】

前記有効微生物の少なくとも 1 種が、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属に属する病原菌に対して拮抗性を持つパントエア (*Pantoea*) 属細菌である

ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の種子病害防除方法。

【請求項 4】

前記有効微生物の少なくとも 1 種が、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属に属する病原菌に対して拮抗性を持つレクレルシア (*Leclercia*) 属細菌である

ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の種子病害防除方法。

【請求項 5】

処理される種子が、アブラナ科、セリ科、ナス科、ウリ科、キク科、ユリ科、アカザ科またはマメ科に属する作物の種子である

ことを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の種子病害防除方法。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法により病害が防除された種子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、種子伝染性病害に感染している種子から病害を防除する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

野菜や草花等の園芸生産に使用する種子は、採種地と呼ばれる圃場や温室、ビニールハウス等の施設内において生産される。これらの採種地では原種と呼ばれる種子生産用の種子を使用して栽培し、種子生産（以下、採種と呼ぶ）を行っている。

【0003】

採種は様々な原種から園芸生産用の種子を生産するのであるが、生産された種子が品種として目的とされる遺伝子型を持ち、十分な発芽力を要していたとしても、病害に感染している場合がある。これらの種子に感染している病害は種子伝染性病害と呼ばれ、病害に感染した採種母本から種子に伝染したものである（農林種子学総論、161-183、中村俊一郎著、養賢堂、1985年；Seed Quality Basic Mechanisms and Agricultural Implications, 160-171, Amarjit S.Basra ed., Food Products Press, 1995）。種子伝染性病害に感染した種子を園芸生産に利用すると、これらの病害感染種子から発病するのはいうまでもなく、育苗、栽培期間中に感染源となって本来無病であった作物にも病害が伝染し、園芸生産上極めて大きな損失となりやすい。また、圃場、温室、ビニールハウスの土壌、施設に病原菌や感染した作物残さが残ると、その後の栽培でも発病が見られることが多い。さらに、野菜、草花種子が海外に輸出されることも近年増加しているが、種子伝染性病害に感染していると諸外国の植物検疫により通関できず、輸出、販売ができない場合もある（Plant Pathogens and the World wide Movement of seeds, Denis C.McGee, APS Press, 1997）。

【0004】

以上のように種子伝染性病害が園芸生産や種子販売、流通にもたらす損失は極めて甚大であり、採種栽培や種子販売において克服すべき大きな課題となって

いる（種子伝染病の生態と防除、大畑貫一等編、（社）日本植物防疫協会、1999年；Seed Technology, Vol.20, 2, 187-197, 1998）。

【0005】

現在、種子伝染性病害の防除のためにとられている対策としては、原種種子の消毒と採種された種子に対する消毒がある。この採種された種子に対する種子消毒は、営利的に広く実施されている。例えば、種子の農薬溶液への浸漬、農薬の粉衣、コーティングあるいは温湯浸漬、乾熱処理等がある（農林種子学総論、183-194、中村俊一郎著、養賢堂、1985年）。これらの種子消毒法は、ある程度の効果は認められるものの、十分な病害防除を行おうとすると種子の発芽率が低下する等といった問題が生じてしまい、必ずしも十分な消毒効果が得られない場合がある。

【0006】

また、近年、種子伝染性病害の被害が急増してきているが、その一因が種子消毒にあることは否めない事実である。それは、種子消毒により種子の外部や内部に生息する病原微生物と共に一般微生物が大幅に減少して種子に微生物的真空状態が生じる結果、微生物界における相互抑制力が低下し、ごく僅かに生き残った病原微生物によっても感染が成立して激しい発病が生じることによる。しかし、そうは言っても、種子伝染性病害の防除という観点から、種子消毒を除外することはできない。病害微生物の汚染程度が高い種子は、種子消毒でもって病原微生物の密度を低くせざるを得ないからである。

【0007】

一方、近年、植物の病害防除において、化学合成農薬とは別に、自然界に存在している有効微生物を利用する試みが進められている（病害防除の新戦略、141-188、駒田旦・稲葉忠興他編、全国農村教育協会、1992年；農業環境を守る微生物技術、家の光協会、1998年；Seed Technology, Vol.20, 2, 198-208, 1998；微生物農薬、山田昌雄編、全国農村教育協会、2000年）。これらの病害防除に利用される有効微生物は、病原菌に対して拮抗性を持ち病原菌の増殖を抑制するものであり、化学合成農薬とは違い、自らが増殖するので防除効果が長続きする、農薬耐性菌の発生が抑えられることや、元々自然界に存在する微生物であるので

環境汚染の恐れが少ない等の利点がある。

【 0 0 0 8 】

しかしながら、とりわけ病害を防除するといった効果の面のみで考えてみると、化学合成農薬より優れるといえるものはほとんどないのが現状である。その要因は、大きく以下の2点にまとめられる。

(1) 多様性に富む微生物界において、病原菌と呼ばれる少種の菌株にのみ抑制効果が有効な菌株では、処理後に淘汰を受け定着しにくい。

(2) 多様性に富む栽培条件下においては、必ずしも有効微生物にとって生存に有利な環境ばかりではない。そのため、単一菌株では病原菌に対する抑制効果を安定して発揮しつづけることができず、結果的に目的とする防除効果が十分に得られない。

【 0 0 0 9 】

これらを克服するために、有効微生物の生存に有利な環境作りが考案されてきた。すなわち、担体（キャリアー）と呼ばれる物質（コーラル、ピートモス、ゼオライト、バーミキュライト、パーライト、炭など）や有効微生物のエサとなる基質（モミガラ、わら、紙パルプ、カニガラ、米ぬか、油粕など）を処理の際に添加することで有効微生物の隠れ蓑を提供し、他の一般微生物および環境の変動から保護することで有効微生物の生存を安定させるといった方法である（拮抗微生物による病害防除、86-90、木嶋利男著、農文協、1992年）。この方法は、有効微生物による土壌処理において種々提案されている（特開平6-56616号、特開平11-106306号）。

【 0 0 1 0 】

また、種子の病害防除を目的とした有効微生物の利用技術も、数多く提案されている（特開平5-51305号；特開平6-253827号；特開平7-25716号；特開平7-75562号；特開平9-224655号；特開平10-203917号；特開平11-4606号；特開平11-253151号；米国特許第4886512号；Annual Review of Phytopathology 31, 53-80, Cook, R.J., 1993；HortTechnology, 345-349, 2(3), M.B.Bennett, V.A.Fritz, N.W.Callan, 1992）。

【 0 0 1 1 】

しかしながら、種子での有効微生物の生存に有利な環境作りとして、事前に物理的・化学的手法で種子が保菌する微生物量を抑えることにより、一般微生物による有効微生物への影響を少なくするとともに病原菌による汚染をある程度抑制し、その後、有効微生物、とりわけ複数の有効微生物で処理することにより、更なる病害防除を図るとともに栽培環境の変動に対応させるという技術は開発されていなかった。

【 0 0 1 2 】

なお、特表平8-503223号公報には、有効微生物としてシュードモナス属の菌株を用いて、これと特定の農薬とを組み合わせる相乗性殺微生物剤組成物が提案されている。しかしながら、このように有効微生物と農薬とを同時処理する場合、有効微生物の処理方法と農薬の処理方法とが同一となるため、種子病害防除に最適な有効微生物の処理方法や農薬の処理方法を個々に選択できない。また、同時処理では、有効微生物に影響のない農薬か、農薬に耐性をもつ有効微生物しか利用できず、そのため、特表平8-503223号公報でも、有効微生物と農薬を限定して有効微生物に影響のない組み合わせが選択されている。

【 0 0 1 3 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、以上の点に鑑みてなされたものであり、野菜や草花等の種子から効率的に種子伝染性病害を防除し、高品質の無病種子を得ることができる方法を提供することを目的とする。

【 0 0 1 4 】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記の課題を克服すべく鋭意検討した結果、種子伝染性病害をもたらす病原菌に対して、まず乾熱処理や化学物質による処理などの物理的・化学的手法による種子消毒を行なった後、同病原菌に拮抗作用を持つ有効微生物で種子を処理することにより、目的とする種子の病害防除ができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 5 】

すなわち、本発明の種子病害防除方法は、種子に対して物理的及び／又は化学

的手法による消毒を施し、この消毒した種子を種子伝染性病害の病原体に対して拮抗性を持つ有効微生物で処理するものである。

【 0 0 1 6 】

本発明の防除方法によれば、種子を有効微生物で処理する前に物理的手法と化学的手法のいずれか一方又は双方で消毒することにより、種子伝染性病害の病原体による汚染がある程度抑制される。また、該消毒によって種子が保有する微生物量が抑えられることにより、一般微生物による有効微生物への影響を少なくして、種子において有効微生物の生存に有利な環境作りがなされる。そのため、消毒後に付与された有効微生物が一般微生物により淘汰されることなく定着し、病害防除効果を有効に発揮することができる。

【 0 0 1 7 】

また、上記した有効微生物と農薬の同時処理と異なり、本発明の方法であると、有効微生物の処理方法と農薬の処理方法とを個々に選択することができる。また、本方法によれば、有効微生物に影響のある薬剤で消毒した場合でも、浸漬処理などで付与すれば該薬剤の有効微生物への影響を抑制することができる。従って、消毒のための物理的・化学的手法と有効微生物との組み合わせの自由度が高い。

【 0 0 1 8 】

本発明では、種子消毒によって生じた種子の微生物的真空状態に対し、有効微生物による積極的な種子汚染によって該真空状態を回避している。この場合、消毒後の種子に多少の病原微生物が存在していても、その感染源ポテンシャルを上回るポテンシャルを有する有効微生物によって種子を再汚染させれば、「感染→発病」の図式成立を断ち切ることができる（種子微生物生態系のバイオロジカルレメディエーション）。このように本発明は、部分消毒種子に対する有効微生物処理による種子伝染性病害防除技術を提供するものである。

【 0 0 1 9 】

本発明の種子病害防除方法においては、前記有効微生物が複数種類の微生物であることが好ましい。すなわち、物理的・化学的手法により消毒した種子を少なくとも2菌株以上の有効微生物で処理することが好適である。このように複数の

有効微生物で処理することにより、多様性に富む栽培条件下においても病原体に対する抑制効果を安定して発揮しつづけることができる。

【 0 0 2 0 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施に関連する事項について詳細に説明する。

【 0 0 2 1 】

図 1 は、本発明に係る種子病害防除方法の概略を示した図である。本発明では、種子の病害防除は 2 段階に分けて行う。第 1 段階では物理的・化学的手法による種子消毒を行い、第 2 段階では生物学的手法として有効微生物による処理を行う。

【 0 0 2 2 】

まず、処理対象の種子としては、一般には、種子伝染性病害の病原体に汚染された病害汚染種子を用いるが、汚染されていない種子に適用して種子伝染性病害の予防を図ることもできる。

【 0 0 2 3 】

第 1 段階における種子消毒の物理的・化学的手法は特に限定されないが、物理的手法としては、乾熱処理や温湯処理などが挙げられる。化学的手法としては、化学合成農薬を用いた浸漬処理、粉衣処理、コーティング処理などが挙げられる。これらの方法は、防除対象病原菌及び一般微生物に対して消毒効果を持つ必要があるが、完全な消毒効果を求めるものではない。むしろ種子への発芽力の低下といった悪影響が出ない程度の条件で、即ち種子に対して無害な条件で処理することが求められる。また、化学合成農薬の粉衣処理の場合、次に処理する有効微生物への影響を十分に検討して処理量を決定しなければならない。

【 0 0 2 4 】

具体的な処理条件は、対象とする種子や種子伝染性病害の種類などにより異なるので一概には言えないが、例えば、上記した乾熱処理では、処理温度 4 0 ～ 8 0 ℃ で処理時間 2 4 ～ 1 2 0 時間の場合に適用範囲が広い。また、上記した温湯処理では、処理温度 4 5 ～ 6 0 ℃ で処理時間 1 0 ～ 6 0 分間の場合に適用範囲が広い。

【 0 0 2 5 】

上記した各方法は、種子の発芽やその後の生育に悪影響が認められない限り、適宜に組み合わせてもよく、その場合、物理的手法同士、化学的手法同士だけでなく、物理的手法と化学的手法を組み合わせることもできる。

【 0 0 2 6 】

かかる第 1 段階の種子消毒により、種子が保有する病原体及び一般微生物の数が低下するので、種子において有効微生物の生存に有利な環境作りがなされる。

【 0 0 2 7 】

そして、第 2 段階において、第 1 段階で消毒された種子を有効微生物で処理することにより、無病種子が得られる。

【 0 0 2 8 】

このような有効微生物としては、園芸作物の種子伝染性病害をもたらす病原菌に対して拮抗性を持ち、種子処理により消毒効果を示し、また、植物体の栽培時において病害発生を抑制できるものであれば特に限定されないが、例えば、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、グリオクラジウム (*Gliocladium*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属などの糸状菌類、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、パントエア (*Pantoea*) 属、レクレルシア (*Leclercia*) 属などの細菌類等が挙げられる。特に好ましくは、採種された野菜や草花などの種子から分離した有効微生物である。

【 0 0 2 9 】

特定の種子伝染性病害に対して拮抗性を持つ有効微生物は以下のようにして得ることができる。すなわち、種子や土壌などから単一に分離された糸状菌および細菌（以下、候補菌という。）を、防除の対象とする種子伝染性病害の病原菌と同一の培地上にて対峙もしくは交差するように塗抹し、病原菌の生育適温下にて数日間培養する（対峙培養）。培養後、双方の生育を観察して、病原菌の生育が候補菌によって明らかに抑制されているものを、拮抗性を持つ有効微生物として選択する（植物病原性微生物研究法、459-474、脇本哲監修、ソフトサイエンス社、1993年）。

【 0 0 3 0 】

有効微生物の種子への処理方法は特に限定されないが、例えば、有効微生物の培養液を希釈してその中に種子を浸漬する方法、公知の方法（特開平5-207807号）で種子をペレット加工する時にタルク等の造粒材中へ目的とする有効微生物を混合する方法、公知の方法（特開平11-146707号）でフィルムコーティングする際にコーティング液中に有効微生物を混合する方法などが挙げられる。また、公知の方法（特開平9-140219号、特開平9-220002号）で播種前に種子へ吸水処理を行い発芽改善処理をする場合に、目的とする有効微生物とともに吸水処理してもよく、この場合、処理中に有効微生物が増殖して種子の表面や内部に良く付着するので、効率が良い。これらの処理方法は、種子への悪影響が認められない限り、適宜に組み合わせても、あるいは複数回処理してもよい。

【 0 0 3 1 】

この第2段階では、1種類の有効微生物で種子を処理することもできるが、有効微生物の種子への定着率を高めて、多様性に富む栽培条件下においても病原体に対する抑制効果を安定して発揮するために、同一の種子伝染性病害の病原菌に対して拮抗性を持つ複数種類の有効微生物で処理することが好適である。その場合、複数の有効微生物は、異なる菌株であれば、同じ種でも異なる種でもよく、また、同じ属でも異なる属でもよい。但し、有効微生物による病害の抑制に重要な要因となる種子（植物体）及び土壌への定着に幅を持たせるといった観点から、生育適性の異なる菌株で処理することが望ましいため、複数の有効微生物は、異なる種、更には異なる属であることが好ましい。なお、かかる複数の有効微生物による複合処理において、微生物の混合比率は特に限定されない。

【 0 0 3 2 】

第2段階において使用する有効微生物の処理量は、対象とする野菜や草花の種類、種子伝染性病害、有効微生物の種類、処理方法、栽培地の環境等によって変わるので一概には言えない。また、栽培は自然環境下で行われるため、気象や天候等の環境変化により、有効微生物の処理方法や処理量を変化させて対応することが好ましい。

【 0 0 3 3 】

以上の第2段階の処理では、第1段階で有効微生物の生存に有利な環境作りが

なされた種子に対して有効微生物を付与するため、付与した有効微生物が一般微生物により淘汰されることなく種子に定着する。特に、複数の有効微生物による複合処理をすることによって有効微生物の定着性が向上し、安定した病害防除効果が得られる。

【 0 0 3 4 】

また、このようにして付与された有効微生物は、化学合成農薬とは違い、微生物自らが増殖するので防除効果が長続きする利点があり、種子の表面や内部に増殖した有効微生物によって種子が無病であるばかりでなく、栽培中の病害発生を防除することも可能となる。また、採種地や園芸生産の土壌に有効微生物を定着させることができれば、永年的に種子伝染性病害を防除できるので防除作業が省力化できる。

【 0 0 3 5 】

さらに、本発明の病害防除方法では、このように二段階で処理するものであって第 1 段階の種子消毒で完全な防除をするものではないので、発芽率の低下などの悪影響を低減することができる。

【 0 0 3 6 】

本発明が利用できる園芸作物の種子は、特に限定されないが、例えばタマネギ、ネギ等のユリ科作物、ニンジン、セルリー、ミツバ等のセリ科作物、キャベツ、ブロッコリ、ハクサイ、ダイコン、カブ等のアブラナ科作物、レタス、サラダナ、シュンギク、ゴボウ等のキク科作物、ハウレンソウ、フダンソウ、テンサイ等のアカザ科作物、トマト、ナス、ピーマン、トウガラシ、トルバム、アカナス、タバコ等のナス科作物、キュウリ、メロン、スイカ、カボチャ、カンピョウ等のウリ科作物、スイートコーン等のイネ科作物、及び、エンドウ、ソラマメ、インゲン、ダイズ等のマメ科作物などの食用園芸作物、並びに、パンジー、ペチュニア、アフリカハウセンカ、ユーストマ、ナデシコ、ハボタン、ストック、プリムラ、ヒマワリ、ジニア、マリーゴールド、アスター、キンギョソウ、シクラメン、バーベナ等の草花類の種子を挙げることができる。

【 0 0 3 7 】

また、本発明で防除を対象とする種子伝染性病害は特に限定されないが、例え

ば、キャベツの黒斑病(*Alternaria brassicae*)、黒すす病(*Alternaria brassicola*)、べと病(*Peronospora brassicae*)、黒斑細菌病(*Pseudomonas syringae* p.v. *maculicola*)、黒腐病(*Xanthomonas campestris* p.v. *campestris*)、根朽病(*Phoma lingam*)、ダイコンの黒斑病(*Alternaria japonica*, *Alternaria brassicae*)、萎黄病(*Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*)、黒腐病(*Xanthomonas campestris* p.v. *campestris*)、ハクサイの黒斑病(*Alternaria brassicae*)、黒腐病(*Xanthomonas campestris* p.v. *campestris*)、黄化病(*Verticillium dahliae*)、ニンジンの黒葉枯病(*Alternaria dauci*)、黒斑病(*Alternaria radicina*)、斑点細菌病(*Xanthomonas campestris* p.v. *carotae*)、セルリーの葉枯病(*Septoria apii*)、菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)、葉枯細菌病(*Pseudomonas syringae* p.v. *apii*)、タマネギの黒斑病(*Alternaria porri*)、灰色腐敗病(*Botrytis allii*)、菌糸性腐敗病(*Botrytis byssoidea*)、乾腐病(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*)、べと病(*Peronospora destructor*)、ハウレンソウのべと病(*Peronospora farinosa*)、萎凋病(*Fusarium oxysporum* f.sp. *spinaciae*)、炭そ病(*Colletotrichum dematium*)、トマトの輪紋病(*Alternaria solani*)、かいよう病(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)、斑点細菌病(*Xanthomonas campestris* p.v. *v esicatoria*)、ナスの褐斑病(*Alternaria solani*)、褐紋病(*Phomopsis vexans*)、及び、キュウリの黒斑病(*Alternaria cucumerina*)、斑点細菌病(*Pseudomonas syringae* p.v. *lachrymans*)、褐斑細菌病(*Xanthomonas campestris* p.v. *cucurbitae*)等が挙げられる。また、草花類では、例えばジニアの黒斑病(*Alternaria znniae*)、斑点細菌病(*Xanthomonas campestris* p.v. *znniae*)、ヒマワリの菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)、黒斑病(*Alternaria helianti*)、及び、ハボタンの黒腐病(*Xanthomonas campestris* p.v. *campestris*)等が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明する。実施例では、有効微生物として、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属に属する種子伝染性病害の病原菌に対して拮抗性を持つパントエア (*Pantoea*) 属細菌およびレクレルシア (*Lecle rcia*) 属細菌を使用した種子病害防除技術について説明するが、本発明はこれに

よって限定されるものではない。

【0039】

(有効微生物のスクリーニングおよび培養)

キャベツ種子（一号、早秋、春ひかり七号、若峰、ウィナーおよび1488、いずれもタキイ種苗株式会社製）、ブロッコリ種子（アンフリー747およびドシコ、ともにタキイ種苗株式会社製）、カリフラワー種子（バイオレットクィーンおよびスノーミスティーク、ともにタキイ種苗株式会社製）、ハクサイ種子（耐病六十日、タキイ種苗株式会社製）、ダイコン種子（耐病総太り、タキイ種苗株式会社製）およびカブ種子（スワンおよび耐病ひかり、ともにタキイ種苗株式会社製）をそれぞれ種子重量当り2.5倍量の生理食塩水（蒸留水にNaClを0.85重量%溶解）中で2.5時間振盪した。振盪後の溶液をアルブミン寒天培地に均一に塗抹した。塗抹後約6日後に、出現したコロニーを単分離して各々ポテト・デキストロース・ブロス寒天培地（Difco社製）上にて黒腐病菌(*Xanthomonas campestris p.v. campestris*)と交差するように塗抹し、25℃で培養した。培養3日後に黒腐病菌の生育を抑制しているものを拮抗性細菌として選抜した。

【0040】

その結果、TK-12、TK-151、TK-185の3菌株が得られた。これらの分類学的性状は下記表1に示す通りである。

【0041】

【表 1】

試験項目	TK-12	TK-151	TK-185
形態	桿菌	短桿菌	短桿菌
グラム染色性	—	—	—
孢子形成	—	—	—
運動性	+	+	+
酸素に対する態度	通性嫌気性	通性嫌気性	通性嫌気性
オキシダーゼ	—	—	—
カタラーゼ	+	+	+
OF試験	F	F	F
集落の色調	NP	NP	黄色系
乳糖からのガスの生成	—	+	—
オルニチンデカルボキシラーゼ	—	—	—
アルギニンジヒドロラーゼ	—	—	—
リジンデカルボキシラーゼ	—	—	—
ウレアーゼ	—	—	—
酸の生成：L-アラビトール	—	—	—
D-ガラクトン酸	+	+	—
5-ケトグルコン酸カリウム	+	—	—
リパーゼ	—	—	—
酸の生成：ビルビン酸ナトリウム	—	+	—
β -グルコシダーゼ	+	+	+
酸の生成：D-マンニトール	+	+	+
D-マルトース	+	+	+
インドールの生成	—	+	—
N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ	—	—	±
β -ガラクトシダーゼ	+	+	+
酸の生成：グルコース	+	+	+
シュクロース	+	—	+
L-アラビノース	+	+	+
D-アラビトール	—	—	+
α -グルコシダーゼ	—	—	—
α -ガラクトシダーゼ	+	+	—
酸の生成：トレハロース	+	+	+
L-ラムノース	+	+	+
イノシトール	+	—	+
アドニール	—	—	—
バラチノース	—	—	—
β -グルクロニダーゼ	—	—	—
酸の生成：D-セロビオース	+	+	—
D-ソルビトール	+	—	—
α -マルトシダーゼ	—	—	—
マロン酸塩の利用	+	+	+
L-アスパラギン酸アリルアミダーゼ	—	—	—

NP：特徴的集落色素を生成せず ±：判定保留

表 1 より、TK-12 株と TK-185 株はパントエア属細菌 (*Pantoea* sp.) と同定され、TK-151 株はレクレルシア アデカルボキシラータ (*Leclercia adecarboxylata*) と同定された。そこで、これらをパントエア sp. TK-

12、パントエア sp. TK-185 (FERM P-17885)、レクレルシア アデカルボキシラータ TK-151 (FERM P-17875)、それぞれ命名し、後二者については工業技術院生命工学工業技術研究所に上記番号で寄託した。

【0042】

(実施例1) キャベツ種子に対する黒腐病防除 (1)

あらかじめ黒腐病に汚染されていることを確認したキャベツ種子(秋徳、タキイ種苗株式会社製)を、40℃で1日間予備乾熱した後、75℃で2日間乾熱処理して物理的手法による種子消毒を行なった。ついで、実施例1-1~3では、YPG液体培地で約25時間培養したTK-12、TK-151およびTK-185の菌液(菌濃度約 3.0×10^9 cfu/g(菌液1g当りのコロニー形成単位数)に調整)に各々10分間浸漬した後、35℃で18時間通風乾燥した。また、実施例1-4では、上記3菌株を同量ずつ混合した菌液に10分間浸漬した後、同様に通風乾燥した。なお、75℃×2日間乾熱処理後の種子を比較例1-1とし、40℃×1日間予備乾熱後の種子を比較例1-2とし、更に、無処理の種子を比較例1-3とした。

【0043】

得られた各種子を、それぞれ2.5倍重量の生理食塩水(0.85重量%NaCl含有)にて2.5時間振盪した後、その振盪溶液を黒腐病菌の半選択培地であるmFS培地およびmCS20ABN培地にて100μlずつ塗抹して25℃でインキュベートした。4日後に両培地上に生じた黒腐病菌のコロニー数をカウントして種子1gあたりの汚染程度を求めた。また、これらの種子を200粒ずつ用いて発芽率を調査した。結果を表2に示す。

【0044】

【表 2】

		処 理	黒腐病菌汚染 程度(cfu/g)	発芽率 (%)
実 施 例	1-1	75°C×2日間乾熱、TK-12処理	2.21×10^2	91.0
	1-2	75°C×2日間乾熱、TK-151処理	8.94×10^2	92.5
	1-3	75°C×2日間乾熱、TK-185処理	5.50×10^2	95.5
	1-4	75°C×2日間乾熱、3菌株複合処理	1.63×10^2	93.0
比 較 例	1-1	75°C×2日間乾熱処理	1.49×10^4	86.5
	1-2	40°C×1日間乾熱処理	1.44×10^5	84.0
	1-3	無処理	3.12×10^5	83.3

表 2 に示すように、乾熱処理だけの比較例 1-1, 2 に比べて、乾熱処理後に拮抗菌で処理した実施例 1-1～4 の方が、黒腐病菌の汚染程度が低く、発芽率が高かった。また、拮抗菌を複合処理した実施例 1-4 は、単一菌株による処理よりもさらに汚染程度の低下を示した。

【0045】

(実施例 2) キャベツ種子に対する黒腐病防除 (2)

あらかじめ黒腐病に汚染されていることを確認したキャベツ種子（早秋、タキイ種苗株式会社製）を、ケミクロン G（日本曹達株式会社製、次亜塩素酸カルシウム剤）500 倍希釈溶液に 10 分間浸漬した後、35°C で 18 時間通風乾燥することにより、化学的手法による種子消毒を行なった。ついで、実施例 2-1～3 では、YPG 液体培地で約 20 時間培養した TK-12、TK-151 および TK-185 の菌液（菌濃度約 2.0×10^9 cfu/g に調整）に各々 10 分間浸漬した後、35°C で 18 時間通風乾燥した。また、実施例 2-4 では、上記 3 菌株を同量ずつ混合した菌液に 10 分間浸漬した後、同様に通風乾燥した。なお、ケミクロン G の 500 倍希釈溶液で処理し、拮抗菌で処理しなかった種子を比較例 2-1 とし、ケミクロン G の 150 倍希釈溶液で処理し、拮抗菌で処理しなかった種子を比較例 2-2 とし、ケミクロン G の 50 倍希釈溶液で処理し、拮抗菌で処理しなかった種子を比較例 2-3 とし、更に、無処理の種子を比較例 2-4 とした。

【0046】

得られた各種子を、それぞれ2.5倍重量の生理食塩水（0.85重量%NaCl含有）にて2.5時間振盪した後、その振盪溶液を黒腐病菌の半選択培地であるmFS培地およびmCS20ABN培地にて100 μ lずつ塗抹して25℃でインキュベートした。4日後に両培地上に生じた黒腐病菌のコロニー数をカウントして種子1gあたりの汚染程度を求めた。また、これらの種子を200粒ずつ用いて発芽率を調査した。結果を表3に示す。

【0047】

【表3】

		処 理	黒腐病菌汚染 程度(cfu/g)	発芽率 (%)
実 施 例	2-1	ケミクロンG500倍希釈溶液、TK-12処理	8.56×10^2	74.0
	2-2	ケミクロンG500倍希釈溶液、TK-151処理	1.88×10^2	75.5
	2-3	ケミクロンG500倍希釈溶液、TK-185処理	9.38×10^2	80.5
	2-4	ケミクロンG500倍希釈溶液、3菌株複合処理	2.06×10^2	82.5
比 較 例	2-1	ケミクロンG500倍希釈溶液処理	1.31×10^4	77.0
	2-2	ケミクロンG150倍希釈溶液処理	2.44×10^3	75.0
	2-3	ケミクロンG50倍希釈溶液処理	4.25×10^2	69.0
	2-4	無処理	2.06×10^5	83.5

表3に示すように、ケミクロンGの500倍希釈溶液処理後に拮抗菌で処理した実施例2-1～4の種子では、汚染程度がケミクロンGの50倍希釈溶液処理と同等にまで低下し、しかもケミクロンGの50倍希釈溶液処理の種子で観察された葉害による発芽率の低下は認められなかった。以上のことから、本発明によれば、葉害を出さずに高い病害防除効果を得られることが示された。

【0048】

（実施例3）ブロッコリ種子に対する黒腐病防除

あらかじめ黒腐病に汚染されていることを確認したブロッコリ種子（ハイツ、タキイ種苗株式会社製）を、ケミクロンGの500倍希釈溶液にて10分間浸漬した後、35℃で18時間通風乾燥した。その後、実施例3-1～3では、YPG液体培地で約20時間培養したTK-12、TK-151およびTK-185の菌液（菌濃度約 2.0×10^9 cfu/gに調整）に各々10分間浸漬した後、35℃で18時間通風乾燥した。また、実施例3-4では、上記3菌株を同量ずつ

混合した菌液に10分間浸漬した後、同様に通風乾燥した。なお、ケミクロンGの500倍希釈溶液で処理し、拮抗菌で処理しなかった種子を比較例3-1とした。また、ケミクロンGの250倍希釈溶液と上記の3菌株の混合菌液とを同量ずつ混合した処理液で処理した種子を比較例3-2とした。さらに、無処理の種子を比較例3-3とした。

【0049】

得られた各種子を、それぞれ2.5倍重量の生理食塩水(0.85重量%NaCl含有)にて2.5時間振盪した後、その振盪溶液を黒腐病菌の半選択培地であるmFS培地およびmCS20ABN培地にて100 μ lずつ塗抹して25℃でインキュベートした。6日後に両培地上に生じた黒腐病菌のコロニー数をカウントして種子1gあたりの汚染程度を求めた。また、これらの種子を200粒ずつ用いて発芽率を調査した。結果を表4に示す。

【0050】

【表4】

		処 理	黒腐病菌汚染 程度 (cfu/g)	発芽率 (%)
実 施 例	3-1	ケミクロンG500倍希釈溶液、TK-12処理	3.88×10^3	94.0
	3-2	ケミクロンG500倍希釈溶液、TK-151処理	7.45×10^3	87.0
	3-3	ケミクロンG500倍希釈溶液、TK-185処理	1.08×10^3	94.0
	3-4	ケミクロンG500倍希釈溶液、3菌株複合処理	25	88.5
比 較 例	3-1	ケミクロンG500倍希釈溶液処理	3.14×10^4	91.0
	3-2	ケミクロンG500倍希釈と3菌株の同時処理	1.02×10^4	90.5
	3-3	無処理	7.65×10^4	91.5

表4に示すように、ケミクロンGの500倍希釈溶液処理後に拮抗菌で処理した実施例3-1～4の種子では、発芽率をほとんど損なうことなく、黒腐病菌の汚染程度が低減されていた。特に、3菌株を複合処理した実施例3-4の種子では、単一菌株による処理に比べて汚染程度が大幅に低減されており、非常に高い種子病原防除効果が認められた。これに対し、ケミクロンGと拮抗菌を同時浸漬処理した比較例3-2では、本拮抗菌がケミクロンGによって殺菌された結果、ケミクロンG単独処理の場合と同等の効果しか得られなかった。

【0051】

(実施例4) キャベツ種子での黒腐病発病抑制効果

上記した実施例2-1～4および比較例2-1, 4の種子を用いて、自然条件とトンネル栽培による加湿条件との2つの条件下にて播種を行ない、育苗2週間後の黒腐病の発病率を調べた。なお、実施例2-1～4の種子を用いた播種試験をそれぞれ実施例4-1～4とし、比較例2-1, 4の種子を用いた播種試験をそれぞれ比較例4-1, 2とした。また、播種は育苗トレイに128粒/区で行った。結果を表5に示す。

【0052】

【表5】

		処 理	自然条件下 での発病率 (%)	加湿条件下 での発病率 (%)
実 施 例	4-1	クミロンG500倍希釈溶液、TK-12処理	12.5	36.0
	4-2	クミロンG500倍希釈溶液、TK-151処理	20.5	8.8
	4-3	クミロンG500倍希釈溶液、TK-185処理	11.8	18.6
	4-4	クミロンG500倍希釈溶液、3菌株複合処理	1.6	2.2
比 較 例	4-1	クミロンG500倍希釈溶液処理	37.0	52.6
	4-2	無処理	52.0	76.5

表5に示すように、化学的手法による種子消毒の後に拮抗菌で処理した種子を用いた実施例4-1～4では、全体的に黒腐病発生が明らかに抑制されていた。但し、単一菌株による処理の実施例4-1～3では、育苗条件によっては定着性が低下し、十分な効果を得られない場合が生じていた。これに対し、複合処理された種子を用いた実施例4-4では、育苗条件の違いによる定着性への影響をほとんど受けずに安定して防除効果を示しており、育苗中の病害の二次伝染が防除できることは明らかであった。

【0053】

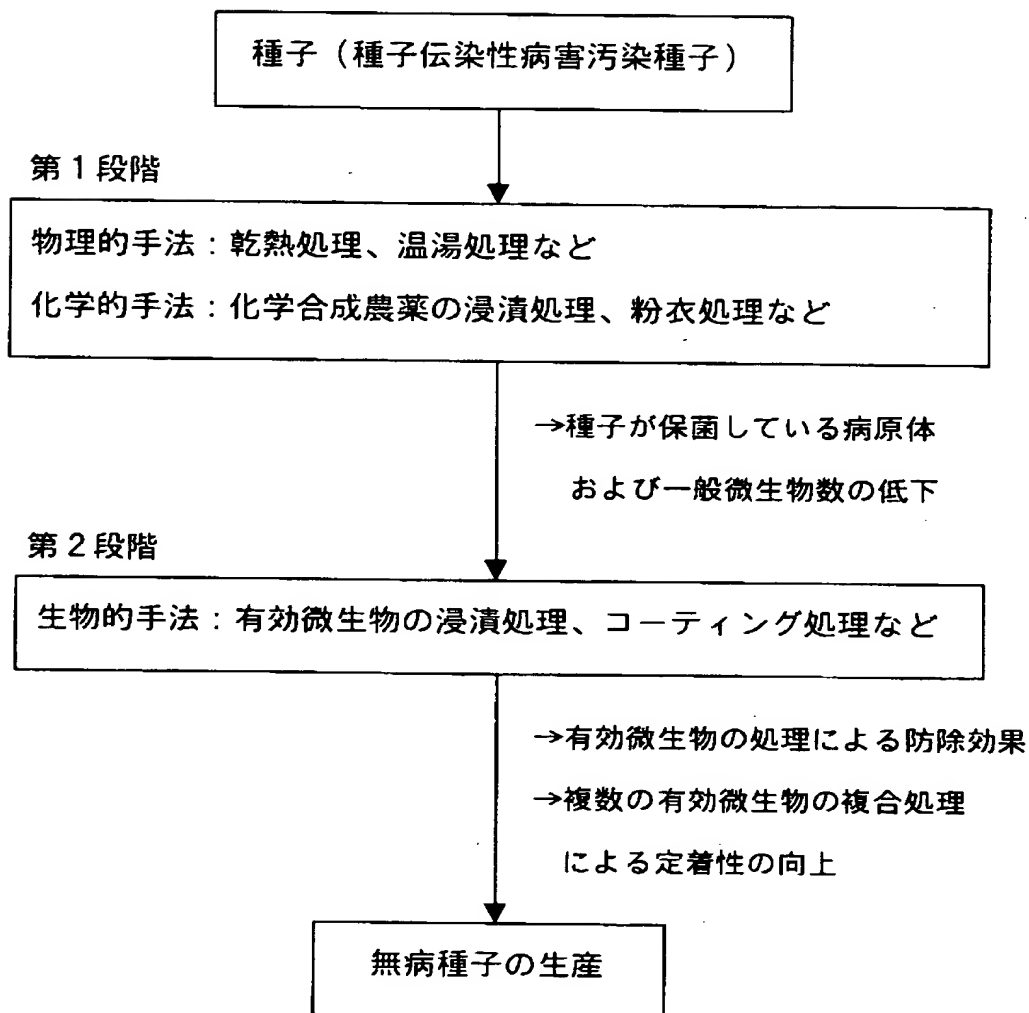
【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば、種子伝染性病害の病原体に対して拮抗性を持つ有効微生物を、物理的・化学的手法による種子消毒によって種子保菌量を

低下させた後に、処理することにより、種子伝染性病害を効率的に防除することができ、発芽率を悪化させることなくしかも発病率の低い高品質の無病種子を得ることができる。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 野菜や草花等の種子から効率的に種子伝染性病害を防除し、高品質の無病種子を得ることができる方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 種子に対して物理的・化学的手法による消毒を施し、種子保菌量を低下させた後、種子伝染性病害の病原体に対して拮抗性を持つ有効微生物で種子を処理する種子病害防除方法である。有効微生物には、複数の菌株を用いることにより、防除効果と定着性を向上させることができる。有効微生物としては、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属に属する病原菌に対して拮抗性を持つパントエア (*Pantoea*) 属細菌やレクレルシア (*Leclercia*) 属細菌が使用できる。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [594003104]

1. 変更年月日 1993年12月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 滋賀県甲賀郡甲西町夏見八田ヶ谷1966

氏 名 株式会社テイエス植物研究所